

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. Dr. E. Ludwig

Zur Technik des histochemischen Esterasennachweises

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Roland Richterich

von Laufen (Bern)



Verlag von S. Karger in Basel
1953

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf
Antrag von Prof. Dr. G. *Wolf-Heidegger*.

Tag der Promotion: 5. Juni 1953.



Acta Anatomica

International Archives of Anatomy, Histology, Embryology and Cytology
Archives Internationales d'Anatomie, d'Histologie, d'Embryologie et de Cytologie
Internationales Archiv für Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellforschung

Basel (Schweiz)

S. KARGER

New York

Separatum Vol. XIV, Fasc. 3 (1952)

Printed in Switzerland

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Basel

Vorsteher: Prof. Dr. E. Ludwig

ZUR TECHNIK DES HISTOCHEMISCHEN ESTERASENNACHWEISES¹⁾

Von R. RICHTERICH

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite		Seite
Einleitung	264	a) Postmortale	
Zur Chemie der lipolytischen		Veränderungen	277
Enzyme	264	b) Fixierungsmittel	277
Grundsätzliches über den Nach-		c) Entwässerung	279
weis von Esterasen.	265	d) Einbetten, Schneiden	
Anforderungen an das Substrat		und Aufkleben	279
bei der Methode Gomoris	267	e) Inkubation	280
<i>Eigene Untersuchungen</i>		2. Die histochemische	
I. Untersuchungen über die		Reaktion	280
Spaltung des Tween 60	269	a) Inkubation	280
1. Die Spezifität der Reaktion	269	b) Entwicklung	283
a) Versuchsanordnung	269	3. Die Paraffinmethode	283
b) Reaktionsgemisch	269	a) Fixierung	284
c) Aktivitätsbestimmung	270	b) Entwässerung	284
d) Resultate.	271	c) Einbetten	284
e) Diskussion	272	d) Schneiden	284
2. Der Einfluß verschiedener		e) Aufkleben	284
Faktoren auf die Tween 60-		f) Entwicklung	285
Spaltung	273	g) Fertigstellung.	285
a) Reaktionsdauer	273	h) Zusammenfassung	285
b) Temperatur.	274	4. Das Gefrierschnitt-	
c) Wasserstoffionen-		verfahren	289
konzentration.	274	5. Das Messertiefkühl-	
d) Substratkonzentration	274	verfahren	289
e) Diskussion	274	6. Kontrollversuche und	
II. Der histiotope Esterasennach-		unspezifische Reaktionen	290
weis	276	7. Die Empfindlichkeit	
1. Die Aktivitätsverluste		der Methode	291
während der Schnittherstel-			
lung	277		

¹⁾ Die Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. G. Wolf-Heidegger, durchgeführt.

Wer sich mit dem mikroskopisch histiotopen Nachweis von Enzymen befassen und seine Befunde kritisch auswerten will, wird sich vor allen Dingen mit der Methodik auseinandersetzen müssen. Die heute bekannten Verfahren sind zum großen Teil einfach zu handhaben und auf beliebige Objekte anwendbar, andererseits aber sind sie hinsichtlich ihrer Spezifität sowie der Fehlerquellen, die durch die Manipulationen bedingt sind, noch nicht restlos erforscht. Nichts beweist dies besser, als die lebhaft diskutierte Diskussion über die Phosphatasennachweise, die z. T. heute noch mit ungenügender Kritik auf alle möglichen Objekte angewandt werden. *Glick* [1949 a] schreibt, die meisten histochemischen Farbreaktionen seien wertlos, da sie sowohl in ihrer Spezifität ungenügend, als auch in ihren topographischen Resultaten ungenau seien.

Übersichtsreferate über Enzymnachweise in situ finden sich bei *Gomori* [1945 a], *Glick* [1949 a] und *Bradfield* [1950], technische Angaben insbesondere bei *Roulet* [1948] und *Glick* [1949 b]. Da wir unsere Aufgabe darin sehen, die Methode *Gomoris* zum Nachweis lipolytischer Enzyme zu überprüfen und letzten Endes ein zuverlässiges Verfahren zur Feststellung dieser Enzyme in Organschnitten zu entwickeln, beschränken wir unsere einleitenden Bemerkungen auf dieses Gebiet.

Zur Chemie der lipolytischen Enzyme (Esterasen).

Über die chemische Natur der Esterasen und über ihre Klassifizierung auf Grund der von ihnen gespaltenen Substrate herrscht noch Unklarheit. Immerhin sind von der Gesamtheit aller Fettsäureester spaltenden Enzyme die Cholinesterase und die Cholesterinesterase abzutrennen, die beide durch ihre Substratspezifität und andere Eigenschaften gekennzeichnet sind. Die verbleibenden Enzyme können Esterasen im engeren Sinne genannt werden. Diese zerfallen in die beiden Hauptgruppen der Lipasen und der unspezifischen Esterasen. Der wichtigste Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen liegt in der Spezifität. Lipasen sollen vorwiegend auf Glycerinester höherer Fettsäuren einwirken, während die unspezifischen Esterasen besonders Ester kürzerer Fettsäuren spalten. Die beiden Fermentgruppen überschneiden sich aber insofern, als Lipasen in einem gewissen Ausmaße auch Ester niedriger Fettsäuren zerlegen, und unspezifische Esterasen auch langkettige Fettsäuren von ihren Alkoholen trennen. Die Spezifität ist also mehr quantitativ als qualitativ. Es ist jedoch ungewiß, ob diese Vorstellung auf Grund von Versuchen mit reinen Enzymen gewonnen worden ist, oder mit Gemischen an sich vielleicht spezifischer Enzyme.

Der Ausdruck Lipase geht auf *Hanriot* [1896] zurück. Dieser Autor bezeichnete damit ein Monobutyryn spaltendes Enzym des Bluteserums. Schon *Arthus* [1902] und *Doyon* und *Morel* [1903 a, b] beanstandeten diesen Namen, da das Serum nach ihren Untersuchungen echte Fette nicht spaltet. Seither herrscht Unklarheit in der Ver-

wendung dieses Ausdruckes. *Gomori* brauchte die Begriffe Lipase und Esterase bis 1948 gleichsinnig, später aber [1949 b] schlug er vor, die lipolytischen Enzyme des Pankreas und des Magendarmkanals als „echte Lipasen“ zu bezeichnen. Über die Synonyme und Unklarheiten der hier als unspezifische Esterasen bezeichneten Enzyme orientiert die Arbeit von *Nachlas* und *Seligman* [1949 b].

Allgemein werden bei den Enzymen an bestimmte Haftpunkte der protoplasmatischen Struktur gebundene Desmoenzyme von den leicht löslichen Lyoenzymen unterschieden. Wie aus der kritischen Arbeit von *Lison* [1948] über die Phosphatasereaktion zu entnehmen ist, werden in histochemischen Reaktionen bloß die Desmoenzyme dargestellt, während die lösliche Enzymfraktion verloren geht. Für die Phosphatasen von großer Bedeutung, scheint uns diese Unterscheidung für die Esterasen nur beschränkt wichtig zu sein. Wie *Bamann* und *Laevenenz* [1934] zeigen konnten, liegen beim Pankreasgewebe nur 1 % der Lipase als Lyoenzym vor, die restlichen 99 % aber als Desmoenzym. Spätere Untersuchungen über die protoplasmatische Verankerung der Leberesterase (*Bamann* und *Mukherjee* [1934]) ließen ähnliche Befunde für das esterolytische Leberenzym erheben. Freilich zeigten diese beiden Forscher, daß durch autolytische Prozesse eine Überführung der Desmoenzyme in die lösliche Form („Erschließung“) erfolgt. Diese Feststellung können wir insofern bestätigen, als wir bei der postmortalen Autolyse einen wesentlichen Aktivitätsverlust beobachteten (Seite 277). Auf eine ähnliche Wirkung des Glycerins werden wir auf Seite 281 zu sprechen kommen. Jedenfalls vollzieht sich bei den Esterasen die Umwandlung von Desmo- in Lyoenzym leicht und dadurch kann bei unkritischer Durchführung von Nachweisreaktionen die erfaßbare Enzymmenge beträchtlich verringert werden.

Bei allen Arbeiten mit Enzymen ist ferner zu berücksichtigen, daß diese sehr wesentliche Unterschiede, nicht nur in ihrer Wirkung, aufweisen. Esterasemoleküle sind offenbar größer als Phosphatasemoleküle. Darauf dürften Unterschiede in der Diffundierbarkeit zurückzuführen sein. Sodann sind die verschiedenen Enzymkomplexe wohl an sehr verschiedenen Stellen des Zellgefüges verankert, die freilich im Einzelnen noch unbekannt sind. Endlich fällt in Betracht, daß es ihrer topographischen Lagerung und dem Orte ihrer Wirksamkeit nach intranukleäre, intraplasmatische, extrazelluläre und solche Enzyme gibt, die ihre Aufgabe an einem Orte erfüllen, der von demjenigen ihrer Entstehung weit abliegt (Sekrete).

Nähere Angaben über lipolytische Fermente finden sich in den Handbüchern von *Oppenheimer* [1925–1939], *Nord* und *Weidenhagen* [1940], *Ammon* und *Dirscherl* [1948], *Bamann* und *Myrbäck* [1941], sowie bei *Bloor* [1943] und bei *Baldwin* [1947].

Grundsätzliches über den Nachweis lipolytischer Enzyme.

Lipolytische Aktivität, also das Vorhandensein von Esterasen im weitesten Sinne, kann mit Hilfe grundsätzlich gleicher Methoden an verschiedenen Objekten ermittelt werden, nämlich erstens an beliebigen Gewebs- oder Organstücken, zweitens an bestimmten Gewebs- oder Zellfraktionen, drittens an histologischen Präparaten. Im zweiten Falle wird das Material durch Sedimentieren, Zentrifugieren und ähnliche Prozesse gewonnen. Diese Methode bleibt aber auf wenige, besonders geeignete Objekte beschränkt, da die saubere Isolierung der erforderlichen Bestandteile recht schwierig ist.

Dem zu untersuchenden Material wird in allen Fällen eine der lipolytischen Spaltung unterliegende Substanz beigelegt, das Substrat. Die Feststellung und die Messung der Spaltung unter gegebenen Bedingungen (Temperatur, pH, Aktivatoren etc.) erfolgt durch den Nachweis bzw. die quantitative Bestimmung der entstandenen Spaltprodukte, also der freiwerdenden Säuren oder Alkohole mit Hilfe eines der zahlreichen chemischen oder physikalisch-chemischen Verfahren. Über diese orientieren die oben erwähnten Handbücher.

Die z. Zt. üblichen Methoden geben zwar im Rahmen ihrer Genauigkeit quantitative Auskünfte über die Aktivität eines Enzyms gegenüber einem bestimmten Substrat. Sie erlauben aber höchstens indirekte Schlüsse auf die präzise Lokalisation eines Enzyms im Gewebe, so z. B. in den Händen von *Huggins* und *Moulton* [1948]. Diese untersuchten den Esterasegehalt des Rattenhodens und stellten eine starke Zunahme der Aktivität fest, wenn das Organ in die Bauchhöhle verlagert war. Da Bauchhoden bekanntlich durch starke Vermehrung der interstitiellen Zellen ausgezeichnet sind, schlossen die Autoren auf Lokalisation des Enzyms in diesen.

Im Mikrotomschnitt stehen zur Messung der Enzymaktivität zwei grundsätzlich verschiedene Verfahren zur Verfügung:

a) Die *Methoden der Carlsberger Schule*, wie sie von *Linderström-Lang* und *Holter* seit 1930 für zahlreiche Enzyme entwickelt wurden. Sie werden von *Holter* und *Linderström-Lang* [1940] und *Linderström-Lang* und *Holter* [1941] ausführlich besprochen. Speziell für die Bestimmung der lipolytischen Aktivität wurde die Mikromethode von *Glick* [1934 a, b] ausgearbeitet. Das Prinzip dieser Verfahren beruht darauf, daß aufeinanderfolgende Mikrotomschnitte abwechselnd chemisch und histologisch untersucht werden. In dem einen Schnitt läßt sich durch Mikrotitration kleinster Säuremengen das vorhandene Enzym bestimmen, und im nachfolgenden können die vorhandenen Zellformen festgestellt werden. Aus dem statistischen Vergleich der Ergebnisse zogen die Autoren Schlüsse auf die topographische Lokalisation der Esterase.

Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß es technisch ziemlich schwierig und in seiner Anwendung auf Organe mit geschichtetem Bau beschränkt ist (z. B. Magendarmtrakt).

b) Die *histiotopen Mikroreaktionen*, bei denen die als Folge der Lipolyse auftretenden Spaltprodukte im Mikrotomschnitt und möglichst in situ in stabile und charakteristisch gefärbte Verbindungen übergeführt werden. Dies kann entweder mit den Fettsäuren oder mit den Alkoholen vorgenommen werden.

Auf den Nachweis der Fettsäuren bezieht sich eine Methode zur histotopographischen Erfassung von Esterasen, die durch *Gomori* [1945 b, 1946] angegeben worden ist und die sich durch ihre Einfachheit auszeichnet. Sie beruht auf dem gleichen Prinzip wie der histochemische Phosphatasennachweis (*Takamatsu* [1939], *Gomori* [1939, 1941]): die entstehenden Fettsäuren werden in unlösliche Metallsalze (Ca, Co, Pb) übergeführt und diese werden als Sulfide sichtbar gemacht.

Den Alkoholnachweis benützt eine Technik, deren Prinzip zuerst von *Menten*, *Junge* und *Green* [1944] für alkalische Phosphatasen angegeben worden war. Entsprechend modifiziert kann sie z. Zt. für verschiedene Enzyme wie Phosphatase, Sulfatase, β -Glukuronidase (*Seligman*, *Manheimer* und *Nachlas* [1949]), so auch für unspezifische Esterasen (*Nachlas* und *Seligman* [1949 a]) verwendet werden. Im Falle der Esterasen besteht sie im wesentlichen darin, daß der bei der Spaltung

des Substrates β -Naphthylazetat freiwerdende Alkohol in einen unlöslichen Azofarbstoff übergeführt wird. Der Nachteil dieser Technik liegt darin, daß die erforderlichen Reagentien nicht haltbar und kompliziert herzustellen sind.

Aus dieser Übersicht geht unseres Erachtens hervor, daß die Methode *Gomoris* vor allen anderen den Vorzug verdient, weil sie übersichtlich ist und kaum Reagentien benützt, die Unklarheiten in den Prozeß hineinbringen. In neuerer Zeit sind freilich von verschiedenen Seiten Zweifel an der Spezifität der von *Gomori* angegebenen Methode geäußert worden (*Huggins and Moulton* [1948], *Nachlas and Seligman* [1949 a, b, c], *Seligman, Nachlas and Mollomo* [1949], *Seligman, Nachlas, Manheimer, Friedman and Wolf* [1949], *Seligman and Nachlas* [1950]). Die genannten Autoren führten vergleichend-chemische Untersuchungen ähnlicher Art durch, wie wir sie unten für die Technik *Gomoris* beschreiben werden. Sie konnten zeigen, daß ihre Methode spezifisch für unspezifische Esterasen ist. Da nun ihr mit dem Nachweis des Alkohols arbeitendes Verfahren annähernd gleiche Resultate ergab, wie das ganz anders aufgebaute Verfahren *Gomoris*, schlossen sie, daß auch dieses nicht für Lipasen, sondern ebenfalls für unspezifische Esterasen spezifisch ist. Diese Lage der Dinge, sowie die Tatsache, daß bis jetzt noch keine Arbeit über eventuelle Fehlerquellen bei der Lipasereaktion nach *Gomori* existiert, haben uns veranlaßt, diese Methode einmal nach verschiedenen Gesichtspunkten zu überprüfen und nach Möglichkeit zu verbessern.

Anforderungen an das Substrat bei der Methode Gomoris.

Von grundsätzlicher Bedeutung ist die Wahl des Substrates, dessen Spaltung zum Nachweis lipolytischer Aktivität benützt wird. Nach *Gomori* [1945 b] muß es vor allem drei Bedingungen erfüllen. Erstens muß es durch das nachzuweisende Enzym gespalten werden, zweitens muß es in Wasser löslich sein und drittens muß die bei der Spaltung auftretende Säure das Enzym nicht hemmende, unlösliche Salze bilden.

Die erste Anforderung *Gomoris* ist insofern wichtig, als ein negativer Ausfall der Reaktion die Abwesenheit eines lipolytischen Enzyms nicht beweist, wenn das Substrat dem Enzym nicht entspricht.

Die zweite Bedingung bedarf einer näheren Prüfung. Für die histochemische Reaktion muß Wasserlöslichkeit schon deshalb gefordert werden, weil es nicht gelingt, mit Emulsionen in Schnitten positive Resultate zu bekommen. Wir selbst haben an Mikrotomschnitten z.B. mit Olivenöl als Substrat Versuche angestellt, ohne nach der Entwicklung der Reaktion eine Bräunung zu erhalten. Wir glauben dies auf ungenügende Permeabilität des Substrates, sei es infolge zu geringen Emulsionsgrades, sei es durch die ungenügende Stabilität der Emulsion, zurückführen zu müssen, die das Öl hinderte, in die Schnitte einzudringen.

Bei den chemischen lipolytischen Aktivitätsbestimmungen wurde bisher mit wenigen Ausnahmen (*Archibald* [1946], *Huggins and Moulton* [1948], *Boissonnas* [1948], *Gomori* [1949], *Nachlas and Seligman* [1949 b]) mit Emulsionen gearbeitet. Emulsionen werden zwar gespalten, wie unzählige Beobachtungen und Versuche zeigen, aber je nach ihrem Emulsionsgrad mit verschiedener Geschwindigkeit. Die Enzymaktivität ist nämlich abhängig von der Oberfläche des Substrates, mit

anderen Worten vom Dispersionsgrad (*Schoenheyder* und *Volquarts* [1945]). Die Spaltung erfolgt daher um so rascher, je geringer die Teilchengröße ist. Daß bei hohem Emulsionsgrad hohe Spaltungsergebnisse auftreten, zeigen besonders die Arbeiten von *Balls*, *Matlack* und *Tucker* [1937/38] und *Balls* und *Matlack* [1938]. Der Emulsionsgrad ist indessen ein Faktor, der schwer zu messen und konstant zu erhalten ist. Folglich liefern Emulsionen ein recht wenig präzises Bild der tatsächlichen Fermentaktivität.

Zum dritten Postulat *Gomori*s ist zu sagen, daß Fettsäuren, sobald sie austreten, sehr rasch durch den Mikrotomschnitt und aus diesem hinausdiffundieren. Folglich müssen sie unmittelbar nach ihrer Entstehung möglichst an Ort und Stelle fixiert werden. Dies geschieht am besten durch ihre Überführung in Calciumsalze. Diese sind sowohl unlöslich in Wasser, als auch unschädlich für das Enzym. Unlösliche Calciumsalze bilden indessen nur verhältnismäßig wenige, meist höhere Fettsäuren, wie Laurin-, Stearin- und Palmitinsäure.

Substrate, die allen diesen Anforderungen gerecht werden, sind die Tweens, oberflächenaktive, synthetische Fette, die von der Atlas Powder Co. Wilmington Del. (*Atlas* [1948]) vertrieben werden. Nach den Versuchen von *Gomori* [1945 b] erwiesen sich insbesondere Tween 60 (ein Stearinsäureester) und Tween 20 (ein Laurinsäureester) als geeignet. Tween 60, dessen Spaltung uns hier beschäftigen wird, ist ein Gemisch von Poly-oxy-aethylen-sorbitan-monostearaten, eine ölige Flüssigkeit, die beim Stehen geliert. Die bernsteinfarbige Substanz mischt sich mit destilliertem Wasser in jedem Verhältnis zu klaren, hochmolekularen Lösungen, die sich allerdings nach längerem Stehen bei Temperaturen über 25° C leicht trüben.

Abgesehen von *Gomori* [1945 b, 1948 a] wurde bis zur Niederschrift dieser Arbeit die lipolytische Spaltung der Tweens durch Enzympräparate nur von *Archibald* [1946] und *Boissonnas* [1948] untersucht. Genauere Angaben macht außer *Gomori* [1948 a] einzig *Archibald* und zwar über die Spaltung von Tween 20, einem Laurinester, durch ein käufliches Pankreaspräparat. Da sich die verschiedenen Tweens durch ihre Fettsäuren unterscheiden, dürfen seine Ergebnisse nicht verallgemeinert werden.

Eigene Untersuchungen.

Wie schon einleitend hervorgehoben, beschränken wir unsere Untersuchungen auf die Überprüfung des Seite 266 skizzierten Verfahrens von *Gomori* mit dem Ziel, eine möglichst allen Anforderungen gerecht werdende Vorschrift für den ortsgetreuen Nachweis von Esterasen im Mikrotomschnitt abzuleiten. Zu diesem Zweck werden wir im Folgenden zuerst einmal die Frage der Spezifität der Reaktion abklären. Anschließend sollen die verschiedenen Faktoren, die die lipolytische Spaltung beeinflussen können, einer näheren Prüfung unterworfen werden. Nach diesen allgemeinen chemischen Untersuchungen über die Spaltung des Tween 60 unter verschiedenen Reaktionsbedingungen wenden wir uns dem histiotopen Nachweis der Esterasen zu und bestimmen die Aktivitätsverluste während der Her-

stellung der histologischen Präparate. Anschließend beschäftigen wir uns mit der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches, sowie mit der Entwicklung der Reaktion. Im Zusammenhang werden dann die beiden wichtigsten Methoden, die Paraffinschnitttechnik und das Messertiefkühlverfahren besprochen, wobei wir gleichzeitig auf die Frage der Diffusion eingehen werden. Zum Schluß werden wir dann noch drei wichtige Fragen besprechen: die unspezifischen Reaktionen, die Kontrollversuche und die Empfindlichkeit der Methode.

I. Untersuchungen über die Spaltung des Tween 60.

1. Die Spezifität der Reaktion.

Die Spezifität der Reaktion versuchten wir so zu bestimmen, daß wir in einer parallelen Serie die lipolytische Aktivität einer Lipase und einer unspezifischen Esterase gegenüber einem Substrat für Lipasen, -Olivenöl-, einem Substrat für unspezifische Esterasen, -Aethylbutyrat-, und dem in Frage stehenden Substrat -Tween 60-, maßen.

a) Versuchsanordnung.

Zu jeder Reihe aufeinander bezogener Versuche verwandten wir jeweils die frischen Organe eines und desselben Schweins, da nach *Bach* und *Lovas* [1932] der Ernährungszustand von wesentlicher Bedeutung für den Lipasegehalt der Gewebe ist und dieser außerdem beträchtliche individuelle Schwankungen aufweist. Alle Versuche wurden mindestens zweimal angestellt, aber mit so übereinstimmenden Resultaten, daß wir sie nicht getrennt zu betrachten brauchen.

b) Reaktionsgemisch.

Als nachzuweisende Enzyme wählten wir die Leberesterase und die Pankreaslipase, die erste als Beispiel einer intrazellulären, unspezifischen Esterase, die zweite als die wichtigste der in einem Sekret enthaltenen Lipasen. Zur Gewinnung beider wurde Leber bzw. Pankreas frisch zerkleinert und nach *Umbreit*, *Burris* und *Stauffer* [1947] mit der von *Potter* und *Elvehjem* [1936] beschriebenen Apparatur homogenisiert. Für einen Versuch wurde jeweils 1 ccm dieses 10 %igen Organhomogenates entnommen. In Vorversuchen stellten wir ein günstiges Mengenverhältnis zwischen dem enzymhaltigen Material und dem Substrat fest.

Als *Substrate* dienen

1. Reines Olivenöl von der Verseifungszahl 185. Die im Reaktionsgemisch auftretende Emulsion entsprach genau den Angaben von *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz* und *Memmen* [1923].

2. Aethylbutyrat als ein von Esterasen bevorzugtes Substrat. Der reine Ester wurde in 200 Teilen Aqua dest. gelöst (*Traube* [1885]) und mit Natronlauge neutralisiert.

3. Tween 60 in 2%iger wäßriger Lösung, ebenfalls mit Natronlauge neutralisiert.

Eine Entfernung der freien Fettsäuren erwies sich bei keinem dieser Substrate als notwendig, da Kontrolluntersuchungen nach der Neutralisation übereinstimmende Resultate ergaben.

Als *Puffer* wurde das Azetat-Veronal-Salzsäuregemisch nach *Michaelis* [1931] gewählt.

Das *Reaktionsgemisch* bestand für jeden Versuch aus 1 cm³ des Enzympräparates, 2 cm³ des Puffers sowie entweder 0,5 cm³ Olivenöl, oder 7 cm³ Substrat 2, oder 5 cm³ 2%iger Tweenlösung. Durch Auffüllung mit kohlensäurefreiem destilliertem Wasser wurde das Volumen des Gemisches bei den Substraten 1 und 3 auf 10 cm³ gebracht, die sich für das Substrat 2 ohne diesen Zusatz ergaben. Zuletzt wurde das Gemisch kräftig durchgeschüttelt.

Die Reaktionsdauer wurde für alle Versuche auf eine Stunde, die Temperatur auf 22° C, das pH auf 7,4 festgesetzt.

c) *Aktivitätsbestimmung.*

Die üblichen Methoden sind zur Bestimmung kleinster Mengen nicht geeignet. Sie leiden an sich schon unter gewissen Mängeln, auf die besonders *Gomori* [1949 a] und *Boissonnas* [1948] hingewiesen haben.

Nachdem wir in Vorversuchen die Bestimmung alkalimetrisch nach *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* [1923] durchgeführt hatten, maßen wir wegen der größeren Genauigkeit die Säureproduktion in den definitiven Versuchen elektropotentiometrisch durch Titration mit n/50 Natronlauge¹⁾. Zu diesem Zweck wurden den 10 cm³ des Reaktionsgemisches vor der Titration 35 cm³ 96%iger Alkohol und 5 cm³ Äther zur besseren Lösung der entstehenden Fettsäuren zugefügt.

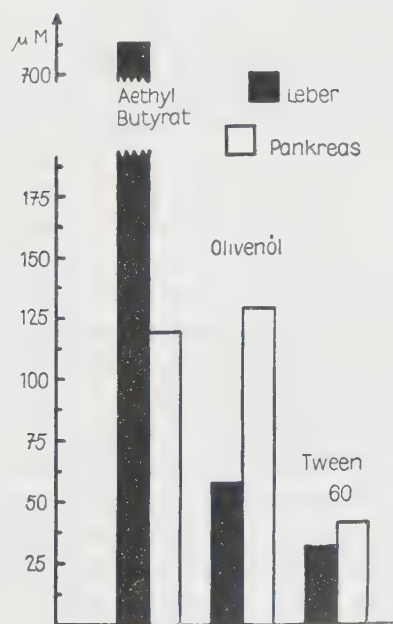
¹⁾ An dieser Stelle möchten wir Prof. Dr. K. *Bernhard* für seine freundliche Erlaubnis danken, diese Bestimmungen in seinem Institut durchzuführen, sowie cand. chem. U. *Gloor* für die geleistete Hilfe bei den elektropotentiometrischen Titrationen.

Nach der Titration erfolgte die rechnerische Auswertung der Resultate nach *Hahn und Weiler* [1926]. Kontrollversuche (Weglassung des Enzyms, bzw. des Substrates) in derselben Versuchsreihe ergaben die Werte für den Puffer, bzw. die Plasmaproteide des Enzympräparates. Diese wurden jeweils vor der Ausrechnung vom Gesamtbetrage der ermittelten Säuren abgezogen.

Um für die Wirksamkeit der beiden Enzyme auf die drei Substrate vergleichbare Werte zu erhalten, wurde dem Vorschlage von *Gomori* [1949 a] entsprechend umgerechnet, so daß das Endergebnis schließlich für beide Enzyme und die drei Substrate in Mikromolen (μ M) der aufgetretenen Fettsäuren, bezogen auf 1 cm³ frisches Gewebe vorlag. Vergleichbar ist die Aktivität verschiedener Enzyme natürlich nur dann, wenn sie an einem und demselben Substrat geprüft wird.

d) Resultate.

Das Ergebnis unserer Aktivitätsbestimmungen unter den vorstehend angegebenen Bedingungen ist in der Tabelle 1 graphisch dargestellt. Ersichtlich ist die Spaltung unserer drei Substrate durch die beiden Enzyme im Verlauf einer Stunde bei 22° C, umgerechnet auf Mikromole der entstandenen Fettsäuren. Die sehr intensive Aethyl-



Tab. 1. Vergleichende Darstellung der Spaltung von Aethylbutyrat, Olivenöl und Tween 60 durch Pankreaslipase u. Leberesterase nach einstündiger Reaktionsdauer bei 22° C und einem pH von 7,4, ausgedrückt in Mikromolen (μ M) der freigesetzten Fettsäuren.

butyratspaltung durch Leberesterase und die bedeutend geringere Spaltung durch Pankreaslipase ist für die Spezifität dieser beiden Enzyme recht charakteristisch. Die Spaltung von Olivenöl durch Pankreaslipase ist im Vergleich zu den Befunden anderer Autoren geringfügiger. Dies beruht wohl darauf, daß wir absichtlich keinerlei Aktivatoren zusetzten. Doch zeigt sich auch hier der Charakter der beiden Enzyme recht deutlich, indem das Olivenöl durch die Lipase doppelt so gut gespalten wird, wie durch die unspezifische Esterase.

Hinsichtlich der Tweenspaltung springt der geringe Unterschied in der Wirksamkeit beider Enzyme in die Augen. Im Tween 60 scheint tatsächlich ein Substrat vorzuliegen, das sowohl durch die Lipase des Pankreas, als auch durch die Esterase der Leber in annähernd gleichem Maße gespalten wird.

e) Diskussion.

In unseren Versuchen ist die Spaltung des Tween 60 im Vergleich zu den beiden anderen Substraten geringer, als nach den ersten Angaben *Gomoris* [1945 b] wo es heißt, die Tweens werden halb so gut gespalten wie Olivenöl. Auch an die später [1949 a] von *Gomori* mitgeteilten Zahlen über die Spaltung von Tween 20 reichen unsere Werte nicht heran. Einzelheiten über die Versuchsanordnung *Gomoris* konnten wir nicht feststellen.

Die Resultate *Archibalds* können zum Vergleich mit den unsrigen nicht herangezogen werden. Dieser Autor arbeitete mit Tween 20 und einem käuflichen Enzympräparat; er macht keinerlei Angaben über die Wirksamkeit desselben gegenüber anderen Substraten.

Die Unterschiede zwischen unseren Feststellungen und denjenigen von *Gomori* glauben wir der Verschiedenheit der Substrate zuschreiben zu dürfen. Es ist nämlich bekannt (*Bloor* [1943], *Gomori* [1949 b]), daß Laurinsäureester besser gespalten werden als Stearinsäureester, und das Tween 20 *Gomoris* enthält Laurin-, unser Tween 60 aber Stearinsäure. Eine Erklärung dieses Phänomens steht noch aus.

Wir sind schon auf Seite 4 auf die von verschiedenen Autoren geäußerten Zweifel hinsichtlich der Spezifität der Reaktion von *Gomori* eingegangen. Aus unseren Aktivitätsbestimmungen geht eindeutig hervor, daß das Tween 60 ein Substrat darstellt, das in annähernd gleichem Maße sowohl von Lipasen als auch von unspezifischen Esterasen gespalten wird. Die erwähnten Zweifel sind demnach insofern gerechtfertigt, als durch die histochemische Reaktion *Gomoris* auch die unspezifischen Esterasen erfaßt werden. Die aber ebenso intensive

Spaltung des Substrates durch Pankreaslipase erlaubt nicht, die Reaktion als nur spezifisch für unspezifische Esterasen zu bezeichnen, vielmehr schlagen wir für sie die umfassendere Bezeichnung „Esterase-reaktion“ vor.

Die Tatsache, daß Tween 60, also ein Stearinsäureester, durch eine unspezifische Esterase ebenso gut gespalten wird wie durch eine Lipase, ist an und für sich erstaunlich. Dem Charakter des Substrates nach (Ester einer langkettigen Fettsäure) sollte es sich ja um ein typisches Substrat für Lipasen handeln. Diese Überlegung mag Gomori dazu geführt haben, seine Reaktion als „Lipasereaktion“ zu bezeichnen. Eine Erklärung für diese Tatsache steht noch aus. Prinzipiell können zwei Faktoren dafür verantwortlich gemacht werden; einerseits, daß der Alkohol im Gegensatz zur bisherigen Anschauung doch einen Einfluß auf die Spezifität hat, andererseits, daß die Unspezifität der Reaktion mit den Tweens als Substrat durch die Wasserlöslichkeit bedingt ist. Leider können wir hier nicht mehr näher auf diese interessanten Fragen eingehen.

2. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Ablauf der Reaktion.

Wir wenden uns nun ausschließlich der Spaltung des Tween 60 zu und untersuchen ihre Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren (Reaktionsdauer, pH, Temperatur, Substratkonzentration). Versuchsanordnung, Reaktionsgemisch und Aktivitätsbestimmung bleiben gleich wie oben beschrieben.

a) Abhängigkeit der Tweenespaltung von der Reaktionsdauer.

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, schreitet die Tweenespaltung bei 22° C von der ersten bis zur sechsten Stunde (geprüft nach einer, vier und sechs Stunden) mit gleich bleibender Geschwindigkeit fort, und zwar für Pankreaslipase etwas rascher (entsprechend Tabelle 1) als für Leberesterase. Linear verläuft die Spaltung jedenfalls nur während des untersuchten Zeitraumes. Denn da es sich um eine monomolekulare Reaktion handelt, d.h. um einen katalytisch beschleunigten Zerfall eines Substratmoleküls, nimmt die Spaltung proportional mit der Menge des verfügbaren Substrates ab. Dies führt naturgemäß nach einiger Zeit zu einer Abflachung der Kurve.

b) *Abhängigkeit von der Temperatur.*

Die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit ergibt für beide Enzyme so übereinstimmende Werte, daß sie durch eine einzige Kurve dargestellt werden kann (Tabelle 3). Das Optimum liegt bei 45° C. Das Ansteigen der Aktivität mit zunehmender Temperatur ist sehr ausgesprochen; bei Erhöhung der Temperatur von 37° C auf 45° C steigt die Säurebildung beinahe auf den doppelten Wert.

Verfolgen wir den Spaltungsprozeß während sechs Stunden bei 22 und 45° C, so erweist sich der lineare Charakter des Prozesses als unabhängig von der Temperatur (Tabelle 2).

c) *Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.*

Es ist bekannt, daß das optimale pH für die Wirkung von Esterasen vom verwendeten Puffer abhängt (*Sobotka and Glick* [1934], *Weinstein and Wynne* [1935/1936]). Wir begnügten uns deshalb mit der Feststellung, daß sich zwischen pH 7,0 und 8,0, bei Anwesenheit des Seite 270 erwähnten Puffers keine wesentlichen Unterschiede in der Aktivität ergeben.

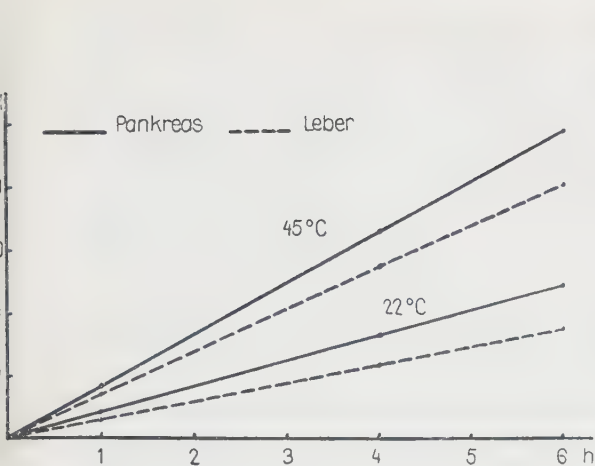
d) *Abhängigkeit von der Substratkonzentration.*

Die optimale Substratkonzentration im Reaktionsgemisch beträgt 30 % Tween 60. Offenbar stellt sich bei dieser Konzentration ein Gleichgewicht zwischen Spaltung und Synthese ein. Die Unterschiede in der Säureproduktion sind jedoch innerhalb der für uns in Frage kommenden Konzentration recht gering.

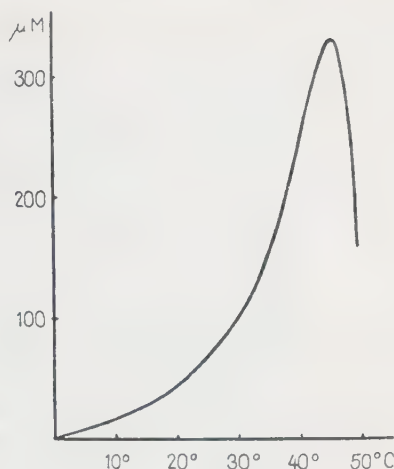
e) *Diskussion.*

Das Temperaturoptimum wird von *Archibald* [1946] für Pankreaslipase und Tween 20 bei 25° C, von *Balls and Matlack* [1938] und von *Balls, Mailack und Tucker* [1937/1938] für Leberesterase und verschiedene Substrate mit 40° C angegeben. Inaktivierung erfolgt nach den zuletzt genannten Autoren bei 50° C; wir konnten diese letzte Feststellung für unsere Versuchsanordnung bestätigen.

Interessant ist die Tatsache, daß wir an unserem Material einen wenigstens am Anfang linearen Verlauf der Spaltung beobachten konnten, während die Pankreaslipase gegenüber allen anderen Substraten schon in der ersten Zeit der Reaktion eine viel kompliziertere Kinetik zeigt. Wir halten es für möglich, daß der bei allen nicht wasserlöslichen Substanzen bisher nur wenig berücksichtigte Emulsions-



Tab. 2.



Tab. 3.

Tab. 2. Abhängigkeit der Spaltung von Tween 60 von der Reaktionsdauer (6 Stunden) und der Temperatur (22° C und 45° C); pH 7,4. Tab. 3. Temperaturabhängigkeit der Spaltung von Tween 60. Reaktionsbedingungen wie Tab. 1.

grad für die Kinetik von wesentlicher Bedeutung ist. Untersuchungen darüber stehen unseres Wissens noch aus.

Die Abhängigkeit der Spaltung von der Substratkonzentration, wie wir sie festgestellt haben, stimmt mit den Angaben von Archibald [1946] überein.

II. Der histiotope Esterasennachweis.

Wir glauben im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt zu haben, daß die Spaltung des Tween 60 eine für Esterasen im engeren Sinne (Seite 264) spezifische Reaktion ist. Wenn wir nun aber zum histiotopen Esterasennachweis übergehen, so ist mit zahlreichen Fehlerquellen zu rechnen, welche die histologischen Manipulationen mit sich bringen. Ihnen ist bis jetzt wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. Die meisten Untersucher bedienen sich bisher, abgesehen von geringfügigen Modifikationen, der Technik Gomoris in ihrer Gestalt von 1946. Einzig Mark [1950] stellte nach Formolfixierung Gefrierschnitte her mit den gleichen Ergebnissen wie Gomori. Bezeichnend für die bestehende Unsicherheit ist, daß nach Stowell und Lee [1950] verschiedene Institute beim histologischen Nachweis von Esterasen auf Schwierigkeiten gestoßen sind. Das legt uns nahe, jede Phase des ganzen Prozesses auf Quellen von Irrtümern zu prüfen und stets auch parallel laufende Kontrollversuche durchzuführen.

Die vorauszusehenden Fehlerquellen sind zunächst Aktivitätsverluste, sei es durch Ausschwemmung, sei es durch teilweise oder gänzliche Zerstörung des Enzyms. Ferner sind falsche Lokalisationen im Gewebe möglich infolge von Diffusion des Enzymes oder der bei der Lipolyse auftretenden Spaltprodukte. Weiterhin ist damit zu rechnen, daß die Empfindlichkeit der Methode nicht erlaubt, Mengen von Esterasen, die unterhalb einer bestimmten Grenze liegen, nachzuweisen. Umgekehrt ist nicht von vorneherein auszuschließen, daß enzymfremde Substanzen im Präparat scheinbar positive, also unspezifische Reaktionen geben. Diese müssen jeweils durch besondere Kontrollversuche nachgewiesen werden.

Als Substrat versuchten wir anfangs Olivenöl, aber wir erhielten keine positiven Resultate, selbst dann nicht, wenn wir sowohl aufgeklebte und entparaffinierte, als auch mit dem Messertiefkühlverfahren hergestellte Schnitte mehrfach durchfrieren ließen, in der Hoffnung, dadurch eine gewisse Auflockerung der Gewebe zu erzielen und damit dem Olivenöl das Eindringen zu erleichtern. Aus diesem Grunde griffen wir zum wasserlöslichen Tween 60 *Gomori*s. Wir gaben ihm den Vorzug, weil es sich schon bei den elektropotentiometrischen Bestimmungen bewährt hatte. In späteren Arbeiten [1946, 1948 b] hat *Gomori* freilich eine ganze Anzahl weiterer Substrate von ähnlichem Bau wie die Tweens empfohlen, lauter wasserlösliche Fettsäureester, doch mußten wir darauf verzichten, auch sie in den Kreis unserer Untersuchungen einzubeziehen.

1. Aktivitätsverluste während der Schnittherstellung.

Dieses Kapitel berührten bisher unseres Wissens nur *Nachlas* und *Seligman* [1949 a]. Ihre Ergebnisse haben aber für uns nur bedingte Gültigkeit. Denn nach der nicht sehr ausführlichen Beschreibung handelt es sich eher um eine Messung der Inhibitionswirkung verschiedener Reagentien auf die Spaltung des β -Naphthylazetats (Seite 267) durch homogenisiertes Gewebe, als um die Messung destruktiver Wirkungen auf das Enzym selbst. *Gomori* [1950 a] erwähnt im Gange befindliche Untersuchungen, die aber unseres Wissens noch nicht publiziert sind.

Zur Feststellung der Aktivitätsverluste gehen wir folgendermaßen vor. Frische Schweinsleber wird in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und von diesen werden Portionen von je 2 g abgewogen. Diese Quanten werden Einflüssen ausgesetzt, die mit der Herstellung mikroskopischer Präparate verbunden sind, nämlich postmortalen

Veränderungen, verschiedenen Fixiermitteln, der Entwässerung, dem Einbetten, dem Schneiden und dem Entparaffinieren. Nachdem die Leberstücke diesen Prozessen unterworfen wurden, wird nach gründlichem Auswaschen in destilliertem Wasser gemäß den Angaben auf Seite 268 ein Homogenat hergestellt und die verbleibende Aktivität wie auf Seite 270 mit Tween 60 als Substrat elektropotentiometrisch gemessen.

a) *Einfluß postmortaler Veränderungen.*

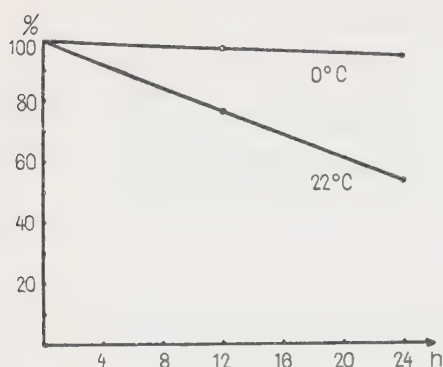
Bei der Untersuchung menschlichen Obduktionsmaterials wird lebensfrischer Zustand desselben in der Regel nicht vorliegen. Daher schien es uns wichtig, die postmortalen Aktivitätsverluste während verschieden langer Zeit und bei verschiedenen Temperaturen zu bestimmen. Prüfen wir nach der oben angegebenen Methode die verbleibende Aktivität von Schweinsleber, die während 24 Stunden einerseits bei 0° C, anderseits bei Zimmertemperatur in verschlossenen Gefäßen aufgehoben war, so ergab sich unter der ersten Bedingung ein Verlust von 5 %, unter der zweiten aber eine Aktivitätseinbuße von mehr als 45 % gegenüber dem Kontrollmaterial aus derselben Leber (Tabelle 4).

b) *Einfluß der Fixierungsmittel.*

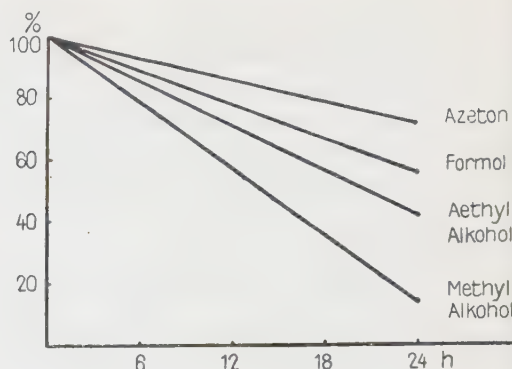
Die günstigste Fixierungsmethode wäre jedenfalls, wie Glick [1948 a] hervorhebt, die zuerst von Altmann [1890] vorgeschlagene und später von Gersh [1932] modifizierte freezing drying method. Da uns die entsprechende Einrichtung nicht zur Verfügung steht, beschränken wir unsere Untersuchungen auf die üblichen Methoden.

Gomori empfiehlt Fixierung in Azeton bei 0° C. Auf dieses Mittel wird die Wahl schon aus dem Grunde am ehesten fallen, weil es seit Jahren zur Trocknung bei der Herstellung von Lipasepräparaten benutzt wird, ohne daß in dem der Trocknung unterworfenen Material wesentliche Enzymeinbußen zu verzeichnen wären (Willstätter und Waldschmidt-Leitz [1923]). Daß die Trocknung mit Alkohol beträchtliche Enzymverluste bedingt, geben dieselben Autoren an. Azeton ist auch deshalb geeignet, weil es gleichzeitig entwässert. Die von Policard [1913] zuerst vorgeschlagene Fixierung bei einer Temperatur von 0° C scheint uns ebenfalls besonders günstig, setzt sie doch die Diffusionsvorgänge recht wesentlich hinab.

Wir fixieren bei 0° C Organstücke von höchstens 5 mm Durchmesser im mindestens 20fachen Volumen chemisch reinen Azetons.



Tab. 4.



Tab. 5.

Tab. 4. Postmortale Aktivitätsverluste nach Aufbewahren des Materials bei 0° C und 22° C. Reaktionsbedingungen wie Tab. 1. Tab. 5. Inaktivierung durch die Fixation bei der Seite 278 beschriebenen Versuchsanordnung.

Das technische Produkt ergab uns sehr schwankende und sogar negative Resultate im Mikrotomschnitt. Unreines Azeton bedingte möglicherweise die Schwierigkeiten, von denen *Stowell* und *Lee* [1950] berichten. Nach 2 Stunden werden die Blöcke in Scheiben von 2 mm Dicke zugeschnitten. Nach 12 und 24 Stunden wird die verbleibende Aktivität bestimmt.

Unsere Resultate sind aus der Tabelle 5 ersichtlich. Nach einer Fixierung von 24 Stunden in Azeton beträgt der Aktivitätsverlust 30 %. Damit decken sich unsere Angaben annähernd mit denjenigen von *Nachlas* und *Seligman* [1949 a].

Aus derselben Leber fixierten wir gleichgroße Stücke während 6 und 12 Stunden bei Zimmertemperatur in *Bouinscher* Flüssigkeit, *Müllerscher* Lösung und mit Sublimat-Trichlor-Essigsäure nach *Heidenhein* (*Romeis* [1948]). Nach der Fixierung wurden die Blöcke in ca. 1 mm große Würfel zerhackt und während einer Stunde in fünfmal gewechseltem 96 %igem Alkohol gewaschen und schließlich in destilliertes Wasser übergeführt. Alle diese Fixatoren ergaben schon nach 6 Stunden vollständig negative Resultate.

Proben gleichen Materials fixierten wir unter denselben Bedingungen während 6 und 12 Stunden bei 0° C in Methyl- und Äthylalkohol (96 %ig). Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, betrugen die Aktivitätsverluste nach 24 Stunden beim Äthylalkohol 60 %, beim Methylalkohol sogar 85 %. *Nachlas* und *Seligman* [1949 a] beobachteten nach dieser Fixierung eine vollständige Zerstörung des Enzyms. Daß diese

Angabe für unsere Verhältnisse nicht stimmen kann, zeigt schon die Beobachtung von *Wachstein* [1946], der nach einer vorausgehenden Azetonfixierung, 12 Stunden mit absolutem Alkohol entwässerte und trotzdem noch positive Resultate erhielt. Nach unseren Untersuchungen ist dies durchaus möglich.

Formolfixierung mit anschließendem Auswaschen, wie Seite 278 angegeben wurde, bedingt nach 24 Stunden einen Verlust von 45 %. *Nachlas* und *Seligman* [1949 a] stellten nach Formol eine vollständige Inaktivierung fest. *Mark* [1950] dagegen erhält an formolfixierten Gefrierschnitten von Leber, die mit Tween 60 inkubiert wurden, aber ohne zusätzliche Aktivitätsverluste durch Dehydrierung, Einbettung, Schneiden und Entparaffinieren noch positive Resultate, was nach unseren Aktivitätsverlustbestimmungen wiederum möglich ist.

Abgesehen von den Aktivitätseinbußen bei der Fixierung besteht die Möglichkeit, daß Diffusionsvorgänge qualitative Veränderungen hervorrufen. Wir haben daher stets die Reaktion in der Peripherie der Schnitte mit derjenigen im Zentrum verglichen, konnten aber keinerlei Unterschiede finden, weder in bezug auf die Menge des Enzyms, noch auf seine Lokalisation. Wir glauben deshalb, Trübungen des Resultats durch Diffusion des Enzyms während der Fixierung in Azeton ausschließen zu können. Diese Feststellung gilt naturgemäß auch für die Entwässerung in Azeton und ist dort nicht mehr erwähnt.

c) *Einfluß der Entwässerung.*

Für die Prüfung dieser Frage kam nur noch das Material in Frage, das in Äthylalkohol, in Formol und in Azeton fixiert worden war. Nach 12 und 24 Stunden bei Zimmertemperatur zeigte es sich, daß der Verlust durch Entwässerung jeweils demjenigen der Fixierung entspricht, das heißt, daß die Aktivitätseinbuße in gleichem Tempo fortschreitet wie bei der Fixierung.

Entwässerung azetonfixierten Materials mit Alkohol (*Wachstein* [1946]) ist ungeeignet, weil die Aktivitätseinbuße zu groß wird.

d) *Einfluß des Einbettens, Schneidens und Entparaffinierens.*

Die Bedeutung dieser Manipulationen wurde nur für das azetonfixierte Material geprüft, da sich die Aktivitätsverluste nur bei diesem in erträglichen Grenzen halten.

Direkte Übertragung der Blöcke aus Azeton in Paraffin (*Henke* und *Zeller* [1905]) ist nicht zu empfehlen, da Azeton ein schlechtes Lösungsmittel für Paraffin ist und die Präparate daher nicht befrie-

digen. Wir legen deshalb nach dem Vorschlag von *Gomori* das nach c entwässerte Material zunächst in Benzol und zwar in zwei Bäder während je einer halben Stunde bei Zimmertemperatur. Darauf gelangen sie während je 40 Minuten in drei Bäder Paraffin bei 56° C. Nach dem Einbetten werden die Blöcke in 8 μ dicke Schnitte geschnitten und 2 mal 2 Minuten in Xylol entparaffiniert. Nach Passieren der Alkoholreihe (je 3 Minuten Alk. abs., Alk. 96 %ig, Alk. 70 %ig) und Abspülen in destilliertem Wasser (5 Minuten) werden sie auf die verbleibende Aktivität geprüft. Um Vergleiche anstellen zu können, wurden auch für diese Untersuchungen 2 g Frischmaterial verwendet. Die Bestimmungen ergaben etwas wechselnde Resultate, doch überstiegen die Verluste 5 % nicht.

e) *Einfluß der Inkubation und der Entwicklung.*

Zweifellos treten auch während dieser Manipulationen gewisse Aktivitätsverluste ein; wir dürfen indessen annehmen, daß sie bei geeigneter Durchführung recht gering sind, trotzdem wir sie nicht bestimmen konnten.

2. *Die histochemische Reaktion.*

a) *Die Inkubation.*

Die meisten Autoren haben bisher das Inkubationsgemisch von *Gomori* [1946] mit nur geringen Modifikationen übernommen. Einzig von *Kung* [1947] könnte man auf Grund der in seiner Arbeit gemachten Angabe über die Zusammensetzung seines Gemisches vermuten, er habe durch Weglassung des Calciumchlorids eine grundsätzliche Änderung vorgenommen. Er spricht aber nirgends davon und da nicht einzusehen ist, wie bei seinem Verfahren ohne Calciumchlorid unlösliche Salze entstehen können, möchten wir annehmen, die Auslassung dieser Substanz in seinem Rezept beruhe auf einem Versehen.

Gomoris Gemisch [1946] setzt sich folgendermaßen zusammen:

Stock solution I

Glyzerin.	150
Calciumchlorid, 10 %ige Lösung	50
m/2 Maleatpuffer pH 7,2	50
Aqua dest.	750

Stock solution II

Tween 40 oder 60, wäßrige 5 %ige Lösung.

Vor der Inkubation werden 2 cm³ II mit 50 cm³ I gemischt.

Nach unseren Untersuchungen kann der Erfolg der Reaktion in mehr oder weniger großem Maße abhängen von der Zusammensetzung des Gemisches, von der Dauer der Inkubation, von der Temperatur und vom pH.

Zusammensetzung des Gemisches: Unser Gemisch weist folgende Zusammensetzung auf:

Aqua dest., kohlensäurefrei	750
Calciumchlorid, 10 %ige wäßrige Lösung	70
Veronal-Azetat-Salzsäurepuffer nach <i>Michaelis</i> [1931]	30
Tween 60, 5 %ige wäßrige Lösung	150

Dieses Gemisch kann während 14 Tagen im Eisschrank bei 0° C aufbewahrt werden.

An das *Objekt* stellen wir dieselben Anforderungen wie an das Enzympräparat (Seite 269). Für die nachstehend beschriebenen Prüfungen wurde nach zahlreichen Vorversuchen eine einzige Schweineleber verwendet.

Als *Substrat* verwendeten wir ausschließlich Tween 60, aber wir erhöhten seine Konzentration im Vergleich zu *Gomori* von 0,1 % auf 0,8 % des Gesamtgemisches. Dadurch erhielten wir eine etwas raschere und intensivere Reaktion. Die Geschwindigkeit der Spaltung in der Zelleinheit ist bei der histochemischen Reaktion in deutlicherem Maße von der Substratkonzentration abhängig, als bei den früher (Seite 274) erwähnten chemischen Bestimmungen.

Das *Glycerin* empfehlen wir wegzulassen, da es bekanntlich ein Extraktionsmittel für Lipasen ist. Der Aktivitätsverlust durch Glycerin läßt sich an Schnitten leicht nachweisen, indem man diese vor der Inkubation während 6 Stunden in ein Glycerin-Wasser-Gemisch (1:1) einstellt. An so vorbehandelten Schnitten fällt die Reaktion bedeutend schwächer aus, als in normal behandelten Kontrollpräparaten. Diese Tatsache läßt sich durch Extraktion des ja nur spärlich vorhandenen Lyoenzyms allein nicht erklären, es muß vielmehr angenommen werden, daß eine Umwandlung von Desmo- in Lyoenzyme erfolgt (vgl. Seite 265).

Der von *Gomori* empfohlene *Puffer* war nicht herstellbar, da z. Zt. der Versuche die Apfelsäure nicht erhältlich war. Der Puffer dürfte übrigens bei seiner schwachen Konzentration im Gemisch für den Ablauf der Reaktion als solcher belanglos sein, wenn er nicht etwa, wie ein Phosphatpuffer, wegen seiner Wirkung auf das Calciumchlorid, von vorneherein auszuschließen ist. Wir haben deshalb den

Puffer von *Michaelis* [1931] gewählt, weil in diesem Falle auch im alkalischen Bereich kein Ausfall der Calciumsalze zu befürchten ist.

Die Konzentration des *Calciumchlorids* kann höchstens bei sehr großen oder sehr kleinen Mengen dieser Substanz einen Einfluß haben. Zu geringe Konzentration kann negative Resultate bedingen, zu hohe aber, wenigstens theoretisch (wir konnten dies nie beobachten) scheinbar positive Resultate, da diese zu einer Imprägnation des Schnittes mit Calciumsalzen führen könnte.

Die Dauer der Inkubation: Über die Dauer der Inkubation geht die Ansicht der verschiedenen Autoren weit auseinander. *Gomori* [1945, 1946 a] gibt 6 bis 12 Stunden an, *Wachstein* [1946] dagegen im gleichen Gemisch und bei gleicher Temperatur wie *Gomori* 40 bis 48 Stunden. Dies erklären wir damit, daß der von *Wachstein* zur Entwässerung während 12 Stunden verwendete Äthylalkohol eine Aktivitätseinbuße bedingt (Seite 278), der die Verlängerung der Inkubationszeit genau entspricht. Vergleichende Untersuchungen mit unserem Gemisch und demjenigen von *Gomori* [1946] ergaben unter sonst gleichen Bedingungen eine Verzögerung der Reaktion um ca. 3 Stunden im Gemisch von *Gomori*.

Kung [1949] mußte wie *Wachstein* [1946] 40 bis 48 Stunden inkubieren. Ob dies auf dem an sich unverständlichen Fehlen des Calciumchlorids in seinem Gemisch beruht, können wir nicht entscheiden. Wir selbst erzielten ohne Zusatz von Calciumchlorid überhaupt keine positive Reaktion.

Es ist zwecklos, die Inkubationsdauer unbegrenzt auszudehnen, denn die Esterasemengen, die nach den bei schonender Technik eingetretenen Verlusten noch vorhanden sind und innerhalb der Empfindlichkeit der Methode liegen, lassen sich schon nach wenigen Stunden nachweisen. Sie unterscheiden sich von größeren Mengen nur durch die schwächere Bräunung des Präparates.

Mit der Verlängerung der Inkubationszeit nimmt die Diffusion zu und zwar wird es sich vorwiegend um eine Diffusion der bei der Lipolyse auftretenden Fettsäuren handeln.

Die Folgerung aus unseren Feststellungen ergibt sich von selbst. Es ist alles vorzukehren, was eine kurze Inkubation erlaubt. Um den günstigsten Zeitpunkt für die Unterbrechung der Inkubation zu treffen, empfehlen wir, alle paar Stunden, gegebenenfalls sogar stündlich, dem Gemisch Schnitte zu entnehmen und sie zu entwickeln. So kann für jedes Objekt das Optimum der Inkubationsdauer eindeutig festgestellt werden (vgl. „critical timing“, *Danielli* [1945]).

Die optimale Temperatur: Bei der Wahl der Temperatur stützten wir uns auf unsere früheren Untersuchungen (Seite 274) und setzten diese auf 45° C fest. Diese Erhöhung gegenüber der Angabe von Gomori (37° C) bringt eine weitere Beschleunigung der Reaktion und damit Verkürzung der Inkubationszeit mit sich.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration: Diese Frage hat nur insofern eine Bedeutung, als bei einem nicht optimalen pH (optimal zwischen 7,0 und 8,0) die Inkubation stark verlängert werden muß, wodurch Diffusionsvorgänge begünstigt werden. Im übrigen verweisen wir auf die Seite 274 gemachten Feststellungen.

b) Die Entwicklung der Reaktion.

Die Entwicklung zerfällt in zwei Phasen. Die erste bewirkt, daß die während der Inkubation entstandenen Calciumsalze der durch das Enzym frei gemachten Fettsäuren in die entsprechenden Bleisalze übergeführt werden. In der zweiten Phase enthalten die Schnitte ihre charakteristische Bräunung, die auf der Reduktion des Bleinitrates zu Bleisulfid beruht.

Die dem Inkubationsgemisch entnommenen Präparate werden kurz in destilliertem Wasser abgespült und bei Zimmertemperatur während 10 Minuten in eine 2%ige Bleinitratlösung eingestellt. Anschließend wird dreimal je 5 Minuten mit destilliertem Wasser ausgewaschen und dadurch das überschüssige Bleinitrat eliminiert. Durch Einstellen der Schnitte für 2 Minuten in eine jeweils frisch zubereitete 0,5%ige Lösung von Ammoniumsulfid erfolgt die oben erwähnte Reduktion des Bleinitrates zu Bleisulfid, das sich im Schnitt als brauner Niederschlag ablagert. Abschließend wird mindestens eine halbe Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen.

3. Die Paraffinmethode.

Als besonders zuverlässig hat sich uns die Reaktion in Paraffinschnitten erwiesen. Sie muß aber in ganz bestimmter Weise durchgeführt werden, da sonst Diffusionsphänomene das Resultat hochgradig trüben können. Glick [1949 a], der sonst den histochemischen Reaktionen recht skeptisch gegenübersteht, zieht eine Verlagerung des Enzyms selbst durch Diffusion kaum in Betracht. Wir vermuteten indessen von Anfang an, daß insbesondere während des Aufklebens der Schnitte mit der Möglichkeit einer Enzymdiffusion zu rechnen sei. Eingehende Untersuchungen über diese Frage, speziell hinsichtlich

des Esterasenachweises sind uns nicht bekannt. Immerhin glaubt *Gomori* [1950 a], daß Unterschiede zwischen seinen eigenen Ergebnissen und denen von *Nachlas* und *Seligman* [1949 a, c] auf Diffusionsvorgänge zurückzuführen sind, die das Verfahren dieser Autoren beeinträchtigen. Bei seinem eigenen Verfahren konnte er aber, im Gegensatz zu uns, nie Diffusionsphänomene beobachten.

a) *Fixierung.*

Lebensfrisches Material wird in Blöcke von höchstens 5 mm Dicke geschnitten und bei 0° C in chemisch reines Azeton gelegt. Nach 2 Stunden werden die Blöcke zu Scheiben von 2 mm kleinster Kantenlänge zugeschnitten und in frisches Azeton gebracht. Ein zweiter Wechsel der Flüssigkeit erfolgt nach der fünften Stunde. Nach 8 Stunden ist die Fixierung beendet. Durch diese kurze Fixierung wird der Aktivitätsverlust im Vergleich zum Verfahren *Gomoris*, das 12 bis 24 Stunden Fixierung vorschreibt, von 30 %, bzw. 15 % auf 10 % vermindert.

b) *Entwässerung.*

Entwässert werden die Blöcke nach 8stündiger Fixierung während weiterer 8 Stunden in chemisch reinem Azeton bei Zimmertemperatur. Auch hier wird das Azeton nach der zweiten und fünften Stunde gewechselt. *Gomori* empfiehlt eine Einwirkung von 12 bis 24 Stunden, was die Aktivitätsverluste um 7 %, bzw. 23 % erhöhen würde. Eine Entwässerung von 8 Stunden ist jedoch vollständig genügend.

c) *Einbetten.*

Diesen Prozeß haben wir schon Seite 280 ausführlich beschrieben, so daß wir hier darauf verzichten können.

d) *Schneiden.*

Wählt man die Paraffinschnitte nicht allzu dünn – am besten hat sich für ein esterasereiches Organ wie die Leber eine Dicke von 8 μ bewährt –, so ist die Reaktion stets sauber und scharf lokalisiert, sobald alle übrigen Bedingungen unserer Vorschrift inne gehalten werden.

e) *Aufkleben der Schnitte.*

Diese Manipulation ist hinsichtlich der Diffusion die gefährlichste unseres Verfahrens; rasches und präzises Arbeiten ist hier besonders

wichtig. Überträgt man z.B. Paraffinschnitte von Schweinsleber, die sich in frischem Zustande mit der Titrationsmethode als reichlich enzymhaltig erwies, auf stark mit Wasser beschickte Objektträger, streckt sie langsam und läßt sie nach nur flüchtigem Abtropfen bei 37° C trocknen, so fällt die Reaktion in der Peripherie der Schnitte viel intensiver aus als im Zentrum, und zudem entsteht ein fast schwarzer Saum rings um den Schnitt herum, oft in konzentrischen Linien, der sukzessiven Verdunstung des Wassers entsprechend (Abbildung 1). Offenbar verstärkt die Erwärmung im Thermostaten die durch das viele vorhandene Wasser schon begünstigte Diffusion, und eine Strömung von Esterase stellt sich in zentrifugaler Richtung ein.

Dies läßt sich vermeiden, indem man die Schnitte möglichst rasch auf einem 29° C bis 32° C warmem Wasserbad streckt, sofort mit dem Objektträger auffängt, der mit einer hauchdünnen Schicht Eiweißglyzerin bestrichen ist, und sie mit Fließpapier möglichst weitgehend trocknet. Die vollständige Austrocknung im Thermostaten erfolgt dann sehr rasch, und die Diffusion unterbleibt (Abbildung 2).

Gomori [1945 b] empfiehlt zur Vermeidung der Diffusion die aufgeklebten und entparaffinierten Schnitte mit einem Kollodiumfilm zu überziehen. Später [1946 a] durchtränkt er die ganzen in Azeton fixierten Blöcke vor der Paraffineinbettung mit Azetylzellulose, um sowohl eine Schrumpfung der Gewebe, als auch die Diffusion des Enzyms zu verhindern.

Nachdem wir zufällig festgestellt hatten, daß die Reaktion in nicht entparaffinierten Schnitten besonders schön positiv ausfällt, verglichen wir das Verhalten solcher Schnitte mit nach *Gomori* kollodionierten, bzw. mit Azetylzellulose durchtränktem Material. Nicht entparaffinierte Schnitte, die wie oben beschrieben aufgeklebt und sofort nach dem Trocknen inkubiert wurden, ergaben weitaus die besten Präparate. Die Diffusion wird vollständig vermieden, das interlobuläre Gewebe zeigt keinerlei positive Reaktion (Abbildung 3). Die Spaltung ist viel intensiver als bei den beiden anderen Verfahren, die wir prüften, und die Reaktion ist in der halben Zeit ebenso intensiv wie bei den Präparaten mit dem Kollodiumfilm. Bei den kollodionierten Schnitten diffundiert das Enzym stellenweise in das interlobuläre Gewebe und kann dort intensiv braune Flecken verursachen (Abbildung 4). Auch in den Kollodiumfilm hinein erfolgt eine gewisse Diffusion, und die Peripherie des Schnittes ist meist intensiver positiv als das Zentrum. Bei den mit Azetylzellulose durchtränkten Schnitten ist die Diffusion geringer als bei den kollodionierten, die Verzögerung

der Reaktion ist aber etwa gleich stark. Die Methode der Wahl ist demnach die Inkubation der nicht entparaffinierten Schnitte¹⁾).

f) Entwicklung der Reaktion.

Die Entwicklung der Reaktion wurde schon auf Seite 283 ausführlich beschrieben, so daß wir dorthin verweisen können.

g) Fertigstellung der Präparate.

Die nun braun gefärbten Präparate werden die Alkoholreihe hinaufgeführt und in Nylol kurz entparaffiniert. Die Intensität der Reaktion bleicht allerdings im Xylol etwas aus. In diesem Falle werden die Präparate die Alkoholreihe wieder hinuntergeführt und über destilliertes Wasser nochmals in die 0,5 %ige Ammoniumsulfidlösung eingestellt. Dies gibt ihnen die ursprüngliche Farbtintensität zurück.

Nach Entparaffinieren, Verstärken der Sulfidreaktion und Waschen in Brunnenwasser während 15 Minuten kann beliebig gefärbt werden. Eine gute Kernfärbung ergibt Hämalalaun nach *P. Mayer*. Als Kontrastfärbung, die bei Objekten mit geringem Esterasegehalt zur bequemeren Orientierung im Gewebe erwünscht ist, verwenden wir Säurefuchsin; dieses hebt sich vom braunen Bleisulfid schärfer ab als Orange G.

Der Einschluß der Schnitte erfolgt, ob sie gefärbt wurden oder nicht, über Gasolin oder Ligroin in vorher erwärmten, reinen Canadabalsam. Xylol darf als Lösungsmittel desselben nicht verwendet werden, da die Sulfidreaktion darunter leidet.

h) Zusammenfassung der Paraffinmethode.

1. Das möglichst lebensfrische Material wird in kleine Blöcke geschnitten und zur *Fixation* in chemisch reines Azeton bei einer Temperatur von 0° C gebracht. Nach 2 Stunden werden die Blöcke in kleine Scheiben von 2 mm kleinster Kantenlänge zugeschnitten und gleichzeitig das Azeton gewechselt. Nach einem weiteren Wechsel nach 5 Stunden ist die *Fixation* nach 8 Stunden beendet.

2. Zur *Entwässerung* gelangen die Gewebstücke während 8 Stunden in chemisch reines Azeton bei Zimmertemperatur. Auch hier soll das Azeton nach 2 und 5 Stunden gewechselt werden.

¹⁾ Nach Abschluß unserer Untersuchungen begegnete uns eine Arbeit von *Ruyter und Neumann* [1949], in der dasselbe Verfahren zum histochemischen Nachweis einer alkalischen Phosphomonoesterase empfohlen wird.

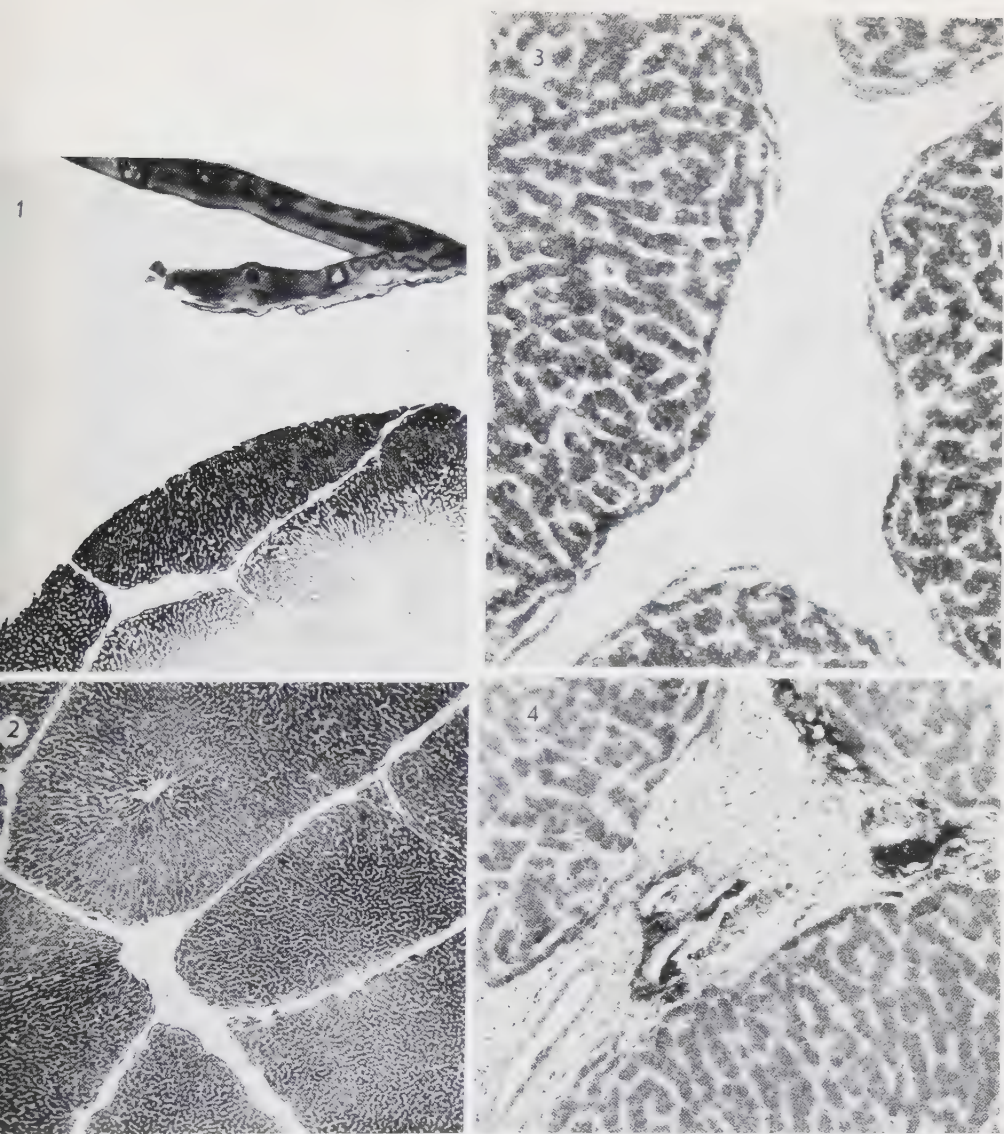


Abb. 1. Schweineleber, Esterasereaktion nach eigener Modifikation (Paraffinschnittverfahren), aber aufgezogener Schnitt langsam getrocknet, Inkubation 6 Stunden, Vergrößerung 27fach. Abb. 2. Schweineleber, Esterasereaktion nach eigener Modifikation (Paraffinschnittverfahren), Inkubation 6 Stunden, Vergrößerung 27fach. Abb. 3. Schweineleber, Esterasereaktion nach eigener Modifikation (Paraffinschnittverfahren), Inkubation 6 Stunden, Vergrößerung 150fach. Abb. 4. Schweineleber, Esterasereaktion nach eigener Modifikation (Paraffinschnittverfahren, aufgezogene Schnitte aber nach der Vorschrift von Gomori [1946 b] mit einem Kollodiumfilm überzogen, Inkubation 8 Stunden. Leichte Gegenfärbung mit Hämalun nach Mayer. Vergrößerung 150fach.

3. Als *Intermedium* legen wir die Schnitte für 2 mal je eine halbe Stunde in ein Benzolbad.

4. Die *Durchtränkung* erfolgt mit niedrigschmelzendem Paraffin im Thermostaten bei einer Temperatur von 56° C. Die Organstücke gelangen hintereinander in drei Bäder und zwar während je 40 Minuten.

5. Nach der *Einbettung* werden die Blöcke während 2 Stunden in kaltem Wasser gehärtet und können dann geschnitten werden.

6. Nach dem *Schneiden* werden die Schnitte mit einem Pinsel in ein Wasserbad von 29° C bis 32° C gebracht und kurz gestreckt. Dann werden sie sofort mit einem Objektträger aufgefangen, der mit einer hauchdünnen Schicht Eiweißglyzerin beschickt ist, mit Fließpapier gut abgetrocknet und für eine Stunde in den Thermostaten von 56° C gebracht.

7. Die trockenen Schnitte gelangen dann sofort zur *Inkubation* in das Seite 281 beschriebene Gemisch.

8. Nach der vorher festgelegten Reaktionsdauer werden die Schnitte aus dem Inkubationsgemisch genommen und *entwickelt*. Sie werden zuerst kurz mit destilliertem Wasser abgespült und dann für 10 Minuten in eine 2%ige Bleinitratlösung eingestellt. Nach 3 mal 5 Minuten Auswaschen in destilliertem Wasser werden die Präparate 2 Minuten in eine jeweils frisch zubereitete 0,5%ige Ammoniumsulfidlösung eingestellt, wodurch sie ihre charakteristische Braunfärbung erhalten. Anschließend wird eine halbe Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen.

9. Zur *Fertigstellung* der Präparate werden diese zuerst die Alkoholreihe hinaufgeführt und in Xylol entparaffiniert. Da dabei die Reaktion meist etwas ausbleicht, gelangen die Schnitte wieder die Alkoholreihe hinunter und über destilliertes Wasser nochmals ins Ammoniumsulfid, wobei die Reaktion wieder die ursprüngliche Intensität annimmt. Nach gutem Auswaschen in fließendem Wasser kann jede beliebige Färbung angeschlossen werden.

10. Der *Einschluß* der Schnitte erfolgt über Gasolin oder Ligroin in etwas erwärmten reinen Canadabalsam.

Unter genauer Beachtung der hier gegebenen Vorschriften erhielten wir sehr konstante Resultate an verschiedenen Organen des Schweins, der Maus, der Ratte und des Menschen. Eine bestimmte Inkubationsdauer ruft an einem gegebenen Organ und unter im übrigen gleichen Bedingungen stets eine bestimmte Intensität der Reaktion hervor.

Die gesamten Aktivitätsverluste bis zur Inkubation betragen bei der Paraffinmethode ca. 25 % (Seite 277–280).

4. Gefrierschnittmethode.

Diese Technik, von *Mark* [1950] erstmals verwendet, hat nach den Angaben des Autors den Vorteil, neben dem Esterasenachweis noch eine Fettfärbung zu gestatten. Diesen Vorteil betrachten wir als höchst problematisch. Im Inkubationsgemisch wird ja der Schnitt mit einem Fett, dem Substrat, durchtränkt. Wenn man also nach der Reaktion auf Fett färbt, so kann man zweierlei zu sehen bekommen, nämlich einerseits allfällige Reste des Substrates, die wohl ziemlich diffus im Schnitt verteilt sein werden, andererseits im Organ von Anfang an vorhandenes Fett. Bei der bekannten Unspezifität der meisten Fettfärbungen wird es nicht möglich sein, Substrate und Organfett auseinanderzuhalten.

Aus diesen Gründen verzichten wir auf eine Beschreibung dieser Methode, besonders da wir in ihr im Vergleich zum nachstehend beschriebenen Messertiefkühlverfahren keinerlei Vorteile sehen und verweisen auf die Originalarbeit.

5. Das Messertiefkühlverfahren.

Als ganz besonders geeignet für histochemische Untersuchungen scheint uns ein Verfahren, auf das bisher unseres Wissens noch nicht aufmerksam gemacht wurde¹⁾. Beim Messertiefkühlverfahren von *Schultz-Brauns* [1931 a, b, 1932] wird das lebensfrische Material unfixiert geschnitten und auf saubere, aber nicht besonders vorbereitete Objektträger aufgefangen. Durch die plötzliche große Temperaturdifferenz koaguliert das Eiweiß der Schnitte und diese kleben von selbst ganz ausgezeichnet. Die Präparate werden dann für 1 Stunde zur Fixierung in chemisch reines Azeton bei Zimmertemperatur eingestellt, während einer Stunde in dest. Wasser ausgewaschen und dann, wie oben beim Paraffinschnittverfahren angegeben, inkubiert, entwickelt und fertiggestellt.

Da die Aktivitätsverluste bei dieser Methode sehr gering sind, genügt eine Inkubation von 1–3 Stunden bei Schweineleber.

Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß damit in kürzester Zeit die Resultate erhalten werden. Es eignet sich jedoch nur für Objekte mit

¹⁾ An dieser Stelle sei Herrn Suter aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut gedankt, der uns zuerst auf diese Möglichkeit hinwies.

nicht zu großem Esterasegehalt, da die Reaktion sonst ziemlich diffus wird. Die Ursache dieser Trübung scheint uns weniger in Diffusionsvorgängen zu liegen, als im rein mechanischen Verwischungseffekt beim Schneiden.

6. Kontrollversuche und unspezifische Reaktionen.

Um irreführende Ergebnisse zu vermeiden, sind Kontrollversuche unerlässlich. Sie sind an Schnitten aus denselben Blöcken durchzuführen, wie die Untersuchung selbst.

Einzelne Schnitte wird man nicht inkubieren, sondern wie gewöhnliche histologische Präparate, z. B. mit Hämalaun nach *P. Mayer* und einer Gegenfärbung behandeln. Sie sind dazu da, Pigmente erkennen zu lassen, die einen ähnlichen Farbton haben, wie Bleisulfid. Diese Pigmente können aber auch mit spezifischen Reaktionen nachgewiesen werden (*Romeis* [1948], *Roulet* [1948], *Glick* [1948], *Gomori* [1950 b]).

Mit anderen Schnitten werden scheinbar positive Resultate, die aber nicht auf einer Enzymaktivität beruhen, als solche festgestellt. Unspezifische Reaktionen können außer durch die oben erwähnten Pigmente durch bestimmte im Objekt vorhandene Metalle (Ca, Sr, Ba), sowie eventuell von Substanzen herrühren, die im Inkubationsgemisch vorhanden sind und eine besondere Affinität zu bestimmten Strukturen des untersuchten Gewebes haben.

Zur Aufdeckung solcher Fehlerquellen sind dreierlei Maßnahmen denkbar, nämlich Inaktivierung des Enzyms vor der Inkubation, Weglassen des Substrates und Inaktivierung des Inkubationsgemisches. Das zuletzt genannte Verfahren halten wir für nicht so günstig, weil recht große Mengen von Inhibitoren, z. B. Natriumfluorid (*Lævenhardt* and *Peirce* [1906/1907]) zugesetzt werden müssen. Wir ziehen es vor, die Schnitte vor der Inkubation während 15 Minuten in kochendes Wasser einzustellen und so das Enzym zu zerstören (*McGrillionay* [1930]). Gleichzeitig stellen wir auch noch ein anderes Präparat durch Weglassen des Substrates her.

Gomori [1950 b] äußert sich ausführlich über den spezifischen Nachweis von Metallen wie Strontium, Barium und Calcium, die in der Entwicklung reagieren und die schließlich ebenfalls Bleisulfide ergeben. Das oben erwähnte Kontrollpräparat mit Weglassung des Substrates enthüllt aber diese Strukturen, die auch in diesem Falle positiv werden.

Das im Inkubationsgemisch vorhandene Calcium scheint keinerlei unspezifische Reaktionen zu bedingen, wie aus den bei unseren Versuchen stets negativen inaktivierten Kontrollpräparaten hervorging.

Für ein eindeutiges Resultat sind also neben der positiven Reaktion im inkubierten Präparat stets noch drei Kontrollpräparate nötig: ein wie ein gewöhnliches histologisches Präparat behandelter Schnitt zur Aufdeckung event. vorhandener Pigmente, ein negatives, durch Weglassung des Substrates erhaltenes Kontrollpräparat zur Enthüllung von Metallimprägnationen des Gewebes und schließlich ein negatives, inaktiviertes Präparat zur völligen Sicherheit.

7. Die Empfindlichkeit der Methode.

Vergleiche über die Sensibilität der verschiedenen Methoden (*Gomori*, *Nachlas* und *Seligman*, eigene Modifikation) anzustellen ist gegenwärtig noch mit Schwierigkeiten verbunden. Unseres Wissens existieren noch keine Angaben über diesen Punkt. Wir selbst konnten die Empfindlichkeit der Methoden unserer Vorgänger nur ungefähr abschätzen; die größte Schwierigkeit liegt dabei in der Verschiedenheit der bisher verwendeten Maßeinheiten.

Dem Vorschlag von *Gomori* [1949 a] entsprechend drücken wir die Aktivität eines Organes in Mikromolen (μM) der Fettsäuren aus, die nach einstündiger Inkubation durch 1 g Organmaterial unter den Seite 271 aufgezählten Bedingungen freigesetzt werden. Es ist natürlich unerlässlich, daß für die chemische Bestimmung dasselbe Substrat wie für die histochemische Darstellung benutzt wird. Unsere Angaben beziehen sich alle auf die Spaltung von Tween 60.

Da die Sensibilität der Esterasereaktion bisher noch nie bestimmt wurde, haben wir selbst ein Verfahren ausgearbeitet, das uns trotz seiner Einfachheit hinlänglich zuverlässig zu sein scheint. Entsprechend abgeändert läßt es sich auch auf andere histochemische Reaktionen anwenden. Es handelt sich um den Vergleich der histochemischen Reaktion mit dem chemisch bestimmten zunehmenden Aktivitätsverlust während einer prolongierten Inaktivierung (= Fixierung) in Azeton.

Wir lassen zwei Experimente nebeneinander hergehen. An einem geeigneten Objekt, z. B. der Leber des Schweines, wird wie Seite 277 bis 278 beschrieben, die verbleibende Aktivität nach einer Azetonbehandlung von 12, 24, 36, 48 und 60 Stunden chemisch bestimmt. Zu den-

selben Zeitpunkten wird dem Azeton Material entnommen und nach der Paraffinmethode histochemisch verarbeitet. Natürlich fällt die Reaktion mit zunehmender Dauer der Azetoneinwirkung schwächer und schwächer aus. Die letzte Andeutung einer solchen entspricht der Empfindlichkeitsgrenze der histochemischen Reaktion und die nach gleich langem Aufenthalt in Azeton ermittelte Säuremenge nach unseren früheren Angaben in μM pro Gramm und Stunde umgerechnet ist das Maß derjenigen Aktivität, die sich histochemisch eben noch erfassen läßt.

Diese liegt bei der Esterasereaktion bei 20 bis 25 μM .

Aus der Tatsache, daß wir in der Cardiaschleimhaut der Ratte histochemisch eine deutliche, wenn auch nicht sehr intensive Reaktion fanden, während *Gomori* [1950 b] daselbst keine Esterasen nachweisen konnte, schließen wir, daß seine Methode etwas weniger empfindlich ist als die unsrige.

Die Empfindlichkeitsschwelle der von *Nachlas* und *Seligman* [1949 a] angegebenen Technik ist uns nicht bekannt. Immerhin können wir durch Vergleich der chemischen Untersuchungen über die Spaltung von p-Nitro-phenyl-propionat durch verschiedene Organesterasen von *Huggins* und *Moulton* [1948] mit den histochemischen Untersuchungen von *Nachlas* und *Seligman* [1949 a], die allerdings mit einem anderen, aber doch prinzipiell ähnlichen Substrat, dem β -Naphthyl-azetat arbeiteten, einige Schlüsse auf die Empfindlichkeit dieser Methode ziehen. Aus diesem Vergleich geht hervor, daß die Sensibilitätsschwelle bei der Methode von *Nachlas* und *Seligman* ungefähr bei 20–30 μM p-Nitro-phenyl-propionat-Spaltung liegt. Daraus geht hervor, daß offenbar auch diese Methode etwas geringere Enzymmengen zu erfassen vermag, als diejenige von *Gomori*.

Nachlas und *Seligman* [1949 a, c] fanden im Magen (Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen), in den Darmzotten und im Colon (Hund), in der Niere und der Prostata (Mensch) nachweisbare Esterasen, während *Gomori* [1950 b] an demselben Material negative Befunde erhob. *Nachlas* und *Seligman* [1949 c] glaubten den Unterschied dadurch erklären zu können, daß sie in den genannten Organen besondere Esterasen annahmen, die mit ihrer Methode nachweisbar sind, derjenigen von *Gomori* aber entgehen. Demgegenüber glaubt *Gomori* [1950 a] den Unterschied auf Diffusionsvorgänge bei der Methode von *Nachlas* und *Seligman* zurückführen zu können.

Die schon erwähnten Untersuchungen von *Huggins* und *Moulton* [1948] beweisen uns, daß die meisten der von *Gomori* als negativ er-

achteten Organe einen recht geringen Esterasegehalt aufweisen (20 bis 30 μ M p-Nitro-phenyl-propionat-Spaltung). Mit unserer empfindlicheren Technik konnten auch wir zeigen, daß sich in der Cardia der Ratte eine zwar nicht sehr intensive, aber doch deutliche Esterase-reaktion abspielt. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß Gomori deshalb über negative Resultate berichtete, weil seine Methode nicht sensibel genug war. Damit fällt auch die Hypothese verschiedener Esterasen (*Nachlas* und *Seligman* [1948 c]) dahin.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Spezifität und Fehlerquellen bei der zuerst von Gomori angegebenen Technik zum Nachweis von Lipasen. Wir fanden:

1. Die Spezifität der Reaktion ist weiter zu fassen als Gomori ursprünglich annahm. Es werden nicht nur die Lipasen erfaßt, sondern, wie schon früher von *Huggins* und *Moulton* und anderen vermutet wurde, auch die unspezifischen Esterasen. Wir schlagen deshalb für diesen Enzymnachweis die richtigere Bezeichnung einer „Esterase-reaktion“ vor.

2. Durch potentiometrische Titration der enzymatischen Spaltung des bei der histochemischen Reaktion verwendeten Substrates – Tween 60 – konnten wir neue, optimale Reaktionsbedingungen festlegen, die zu einer Modifikation des Inkubationsgemisches und der Inkubationsbedingungen beim histiotopen Esterasennachweis führten. So erhöhten wir z. B. die Temperatur von 37° C auf 45° C, um die Inkubationsdauer dadurch zu verkürzen.

3. Mit der gleichen Methode untersuchten wir die Aktivitätsverluste während der verschiedenen Manipulationen, die zur Herstellung der histologischen Präparate unerläßlich sind. Für das unten erwähnte Paraffinschnittverfahren betrugen diese Verluste bis zur Inkubation 25 % der ursprünglichen Esterasenmenge.

4. Bei langsamer Trocknung der aufgezogenen Schnitte kann eine sehr intensive Diffusion des Enzyms auftreten. Bei genauer Beachtung unserer Vorschriften können wir jedoch Diffusionsvorgänge, die zu falschen Resultaten in bezug auf die Lokalisation führen könnten, ausschließen.

5. Als besonders geeignet erwies sich zum histiotopen Nachweis der Esterasen die Paraffinschnittmethode. Abgesehen von geringfügigen Abänderungen empfehlen wir als sehr zweckmäßig die Inkubation nicht entparaffinierter Schnitte.

6. Das Messertiefkühlverfahren, ursprünglich von *Schultz-Brauns* eingeführt und weiter entwickelt, erwies sich ebenfalls in bestimmten Fällen als günstig für unseren Esterasennachweis. Es dürfte sich auch für andere, ähnliche histochemische Reaktionen eignen.

7. Schließlich untersuchten wir die Sensibilität der bisher bekannten Esterasenreaktionen. Mit einem besonders entwickelten Verfahren konnten wir diese auf 20–25 μ M Tween-60-Spaltung festlegen.

Summary.

The method of *Gomori* for the histiotopic proof of esterolytic enzymes is critically examined. The presence of both the lipase and the unspecific esterases can be shown by histochemical reactions. The condition for the best reaction could be determined by electropotentiometric titrations with the substrate—the tween 60—and some other esterolytic enzymes. By this the method of a positive reaction has been improved. The question about false results is carefully discussed, which appear either after diffusion of the enzyme or of their products or which are caused by unspecific reaction of other substances. Finally the exactness of the method is determined by a new method.

Résumé.

La méthode publiée en 1945 par *Gomori* pour la mise en évidence des ferments estérolytiques dans les coupes de tissus fut contrôlée par l'auteur: il ressort de son étude que la réaction histo-chimique en question ne démontre pas seulement les lipases mais aussi les estérases non spécifiques. Les conditions optimales pour la réaction furent déterminées par titration électropotentiométrique en présence du substratum (Tween 60) et plusieurs ferments estérolytiques, ce qui permet à l'auteur de préciser certains points de la technique. Il s'attache à l'étude des résultats erronnés qui peuvent s'observer par diffusion du ferment, par l'apparition de produits intermédiaires ou par les réactions non spécifiques d'autres corps. Détermination de la sensibilité de la méthode.

Zum Schlusse möchten wir nicht verfehlen, Herrn Prof. Dr. *E. Ludwig* für sein reges Interesse sowie für seine große Hilfe bei der endgültigen Abfassung der Arbeit unseren herzlichsten Dank auszusprechen, ebenso auch Herrn Prof. Dr. *K. Bernhard* für die Durchsicht des endgültigen Manuskripts.

LITERATUR

- Altmann, R.*: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig 1890. – *Ammon, R. und W. Dirscherl*: Fermente, Hormone, Vitamine. Leipzig 1948. – *Archibald, R. M.*: J. biol. Chem. 165, 443, 1946. – *Arthus, M.*: J. phys. et path. gén. 4, 56, 455, 1902. – *Atlas Powder Company*: Surface active agents. Wilmington Del. 1948. – *Bach, E. and L. Lovas*: Biochem. Z. 245, 345, 1932. – *Baldwin, E.*: Dynamic aspects of biochemistry. Cambridge 1947. – *Balls, A. K. and M. B. Matlack*: J. biol. Chem. 125, 539, 1938. – *Balls, A. K., M. B. Matlack and J. W. Tucker*: J. biol. Chem. 122, 125, 1937/38. – *Bamann, E. und P. Laeverenz*: Z. physiol. Chem. 223, 1, 1934. – *Bamann, E. und J. N. Mukherjee*: Z. physiol. Chem. 229, 1, 1934. – *Bamann, E. und K. Myrbäck*: Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941. – *Bloor, W. L.*: Biochemistry of the fatty acids. New York 1943. – *Boissonnas, R. A.*: Helv. chim. acta 31 II, 1571, 1948. – *Bradfield, J. R. G.*: Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 25, 113, 1950. – *Doyon, M. et A. Morel*: C. R. Soc. Biol. 55, 682, 982, 1903. – *Gersh, I.*: Anat. Rec. 53, 509, 1932. – *Glick, D.*: C. R. Trav. Lab. Carlsberg, sér. chim. 20, co. 5, 1934 a. – *Id.*: Z. physiol. Chem. 223, 252, 1934 b. – *Id.*: Advances in Enzymology, 9, 585, 1949 a. – *Id.*: Techniques of histo- and cytochemistry. New York Interscience, 1949 b. – *Gomori, G.*: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 42, 23, 1939. – *Id.*: Arch. Path. 32, 189, 1941. – *Id.*: J. Mt. Sinai Hosp. N. Y. 11, 317, 1945 a. – *Id.*: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 58, 362, 1945 b. – *Id.*: Arch. Path. 41, 121, 1946. – *Id.*: J. Lab. and Clin. Med. 34, 275, 1949 a. – *Id.*: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 72, 697, 1949 b. – *Id.*: Exp. Cell Research 1, 33, 1950. – *Id.*: J. Lab. and clin. Med. 35, 802, 1950. – *Hahn, F. L. und G. Weiler*: Z. analyt. Chem. 69, 417, 1926. – *Hanriot, M.*: C. R. Soc. Biol. 48, 925, 1896. – *Henke, K. und L. Zeller*: Zbl. Path. 16, 1905. – *Holter, H. und K. Linderstrom-Lang*: in F. F. Nord und R. Weidenhagen: Handb. der Enzymologie, Leipzig 1940, p. 65. – *Huggins, Ch. and S. H. Moulton*: J. exp. Med. 88, 169, 1948. – *Kung, S. K.*: J. Nat. Cancer Inst. 9, 435, 1949. – *Linderstrom-Lang, K. und H. Holter*: in E. Bamann und K. Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941, p. 1132. – *Lison, L.*: Bull. d'Hist. appl. 25, 23, 1948. – *Loevenhart, A. S. and G. Peirce*: J. biol. chem. 2, 397, 1906/07. – *Mark, D. D.*: Arch. Path. 49, 545, 1950. – *Mc Grillionay, J. H.*: Biochem. J. 24, 891, 1930. – *Menten, M. L., J. Junge and M. H. Green*: J. biol. chem. 153, 471, 1944. – *Michaelis, L.*: Biochem. Z. 234, 139, 1931. – *Nachlas, M. M. and A. M. Seligman*: J. Nat. Cancer Inst. 9, 415, 1949 a. – *Id.*: J. biol. Chem. 181, 343, 1949 b. – *Id.*: Anat. Rec. 105, 677, 1949 c. – *Nord, F. F. und R. Weidenhagen*: Handb. der Enzymologie. Leipzig 1940. – *Oppenheimer, C.*: Die Fermente und ihre Wirkungen. Den Haag 1925–1939. – *Policard, A.*: C. R. Assoc. Anat. 1913, p. 41. – *Potter, V. R. and C. A. Elvehjem*: J. biol. chem. 114, 495, 1936. – *Romeis, B.*: Mikroskopische Technik. München 1948. – *Roulet, F.*: Methoden der pathologischen Anatomie. Wien 1948. – *Ruyter, J. H. C. and H. Neumann*: Biochim. et Biophys. Acta 3, 125, 1949. – *Schoenheyder, F. and S. Volqvarts*: Acta physiol. Scand. 9, 57, 1945. – *Schultz-Brauns, O.*: Zbl. Path. 50, 273, 1931. – *Id.*: Klin. Woch. 10, 113, 1931. – *Id.*: Zbl. Path. 54, 225, 1932. – *Seligman, A. M., L. H. Manheimer and M. M. Nachlas*: Cancer Research 9, 601, 1949. – *Seligman, A. M. and M. M. Nachlas*: J. clin. Inv. in press, zit. nach Nachlas and Seligman, 1949 c. – *Seligman, A. M., M. M. Nachlas, L. H. Manheimer, O. M. Friedman and G. Wolf*: Ann. Surg. 130, 333, 1949. – *Seligman, A. M., M. M.*

Nachlas and *M. C. Mollomo*: Am. J. Physiol. 159, 337, 1949. — *Sobotka, H.* and *D. Glick*: J. biol. Chem. 105, 221, 1934. — *Stowell, R. E.* and *C. S. Lee*: Arch. Path. 50, 519, 1950. — *Takamatsu, H.*: 1939, zit. nach *Bradfield* 1950. — *Traube, E.*: Chem. Ber. 17, 2294, 1884. — *Umbreit, W. W., R. H. Burris* and *J. F. Stauffer*: Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis 1947. — *Wachstein, M.*: J. exp. Med. 84, 25, 1946. — *Weinstein, S. S.* and *A. M. Wynne*: J. biol. Chem. 112, 641, 1935/36. — *Willstätter, R.* und *E. Waldschmidt-Leitz*: Z. physiol. Chem. 125, 132, 1923. — *Willstätter, R., E. Waldschmidt-Leitz* und *F. Memmen*: Z. physiol. Chem. 125, 93, 1923. Eingegangen 15. Mai 1951.